Aus dem Institut für medizinische Chemie und Hygiene
der Universität Göttingen
Direktor: Prof. Dr. F. Schütz

Die Wirkung verschiedener Säuglingsernährungsmilcharten auf pathogene Keime der Coli-Typhus-Gruppe

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt am 10. Juli 1940

von

Werner Korth
aus Kanth, Krs. Breslau

Göttingen 1940

Buchdruckerei Martin Saß & Co., Göttingen

Dekan: i. V.: Prof. Dr. Gg. B. Gruber

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Schütz

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 8. 1940

Für die Ernährung der Säuglinge bedient man sich seit vielen Jahren einer Reihe von Milchen, die durch eine bestimmte Zusammensetzung bei Fehlen der natürlichen und leicht verdaulichen Muttermilch diese ersetzen sollen. Da sich bei Säuglingen die reine Vollmilch als schwer verdaulich erwiesen hat, ging man zu Milchverdünnungen bzw. zu besonders präparierten Milchen über, von denen heute die gebräuchligste die Zitretten- und noch selten angewandt die Bessaumilch sind. Die Bekömmlichkeit dieser beiden Milchen beruht u. a. auf dem Zusatz von Zitronensäure. Durch die Ausfällung des Kaseins mittels der Säure glaubt man den Verdauungsvorgang zu erleichtern. Der Gedanke liegt nahe, ob durch die Säure nicht außerdem eine wachstumhemmende oder abtötende Wirkung auf die Bakterien auftritt.

I.

1. Allgemeine Wirkung von Säuren auf Bakterien.

Über die desinfizierende Kraft der Säuren ist viel geschrieben worden. Bekannt ist, daß besonders die anorganischen Säuren in teils sehr geringen Konzentrationen auf die Mikroorganismen im allgemeinen eine stark desinfizierende Wirkung ausüben, die meist proportional der Stärke der Konzentration der Lösung geht. Aber auch manche organischen Säuren wirken stark kakterizid, so z. B. Weinsäure und Oxalsäure. Dresel untersuchte eine Reihe von Fettsäuren auf ihre Desinfektionskraft hin. Er stellte fest, daß diese mit steigender Zahl von Kohlenstoffatomen stärker wurde, und daß sie ihre größte Wirkung bei Fettsäuren mit mittlerer Zahl von Kohlenstoffatomen erreicht. Bei noch höheren Fettsäuren nahm sie wieder ab. Die Ölsäure bewirkte in einer Verdünnung 1 : 1000 sogar zuletzt Bakteriolyse. Die Abtötung betraf aber nur die grampositiven Bakterien. Die gramnegativen wurden mit einzelnen Ausnahmen nicht angegriffen.

2. Die Einwirkung von Zitronensäure auf Bakterien.

Über den Einfluß der Zitronensäure auf Typhusbakterien berichtet als erster Uffelmann. Um zu einer Methode zu gelangen, Typhusbakterien sicher nachweisen zu können, ging er von der allgemein bekannten Tatsache aus, daß diese Erreger auf sauren Kartoffelstückchen gut wachsen. Er kam zu dem Ergebnis, daß das Bact. typhi auch auf Nährgelatine mit Zitronensäurezusatz wächst und recht hohe Säuregrade verträgt.

Schlüter machte ähnliche Beobachtungen. Wenn er 8 ccm neutrale Gelatine mit Zitronensäure so ansäuerte, daß 4 ccm Natriumkarbonatlösung, die 5,5 g Natronkarbonat in 1 Liter Wasser enthielt, zur Neutralisation erforderlich waren, wuchsen Typhusbakterien noch kräftig; säuerte er aber mit soviel Zitronensäurelösung an, daß 10 ccm zur Neutralisation gebraucht wurden, wuchsen keine Typhusbakterien mehr. Es mußten also genügend Mengen von Zitronensäure zugesetzt werden, um eine Bactericidie zu bewirken.

Auch Liefmann berichtet, daß im Leitungswasser wie auch in einer Stuhlaufschwemmung, die 0,5prozentige Zitronensäure enthielten, sämtliche Typhusbakterien innerhalb 30 Minuten abgetötet wurden.

Riegel untersuchte Zitronensäure auf seine Desinfektionswirkung hin zwecks Trinkwasserherstellung aus verunreinigtem Wasser. Zitronenlimonade, die 0,6prozentige Zitronensäure enthielt, beimpfte er mit Choleravibrionen, Ruhr- und Typhusbakterien. Bei Zimmertemperatur waren die sehr empfindlichen Choleravibrionen schon nach 15—30 Minuten abgetötet, die Ruhrbakterien nach 5 bis 6 Stunden und die Typhusbakterien erst nach 22 bis 24 Stunden. Bei Brutschranktemperatur war die Abtötungszeit nicht wesentlich verkürzt. In nährstoffreicher Flüssigkeit wie der Bouillon, die ebenfalls 0,6prozentige Zitronensäure enthielt, war aber noch nach 24 Stunden dieselbe Keimzahl wie zur Einsaat enthalten.

Fermi stellte ebenfalls fest, daß Typhusbakterien gegen organische Säuren sehr widerstandsfähig sind, denn es waren 4 Trop-

fen einer 10prozentigen Zitronensäurelösung, die zu 5 ccm Agar zugesetzt wurden, nötig, um die Entwicklung des Bact. typhi aufzuheben.

3. Die Einwirkung von Säuren auf Bakterien in Milch.

Über die Einwirkung der Magensäure auf mit verschiedenen Bakterien infizierte Milch hat als erster Hanssen genauere Untersuchungen angestellt von dem Gedanken geleitet, die Ursache der in steigendem Maße im Hochsommer auftretenden Dyspepsien zu finden. Er nahm die Versuche an Hunden vor, denen er nach längerem Hungern die mit verschiedenen Bakterien beimpfte Milch veabreichte, um den Einfluß des Magensaftes zu prüfen. Er fand, daß die mit Bact. coli beimpfte Milch noch nach 2 Stunden durch den Magensaft um nur wenig der voher enthaltenden Keimmenge vermindert war.

Dieses Ergebnis steht in krassem Gegensatz zu den Untersuchungen Scheers über die Bactericidie des Magensaftes, dessen Versuche beweisen, daß Colibakterien von normalem Magensaft gewöhnlich nach 10 Minuten, Typhus-, Paratyphus-B- und Ruhrbakterien aber schon nach 2 Minuten abgetötet waren.

Hieraus ist zu schließen, daß Bakterien in Milch vor der Einwirkung der Magensäure geschützt werden. Damit deckt sich die Feststellung Hailers, der beobachtete, daß nach Zusatz von Salizylsäure, die als gutes Desinfiziens bekannt ist, die Bakterien in der Milch nach kurzer anfänglicher Wachstumbehinderung bald darauf sich stark vermehren.

Wedemann hatte es sich zur Aufgabe gemacht, den Einfluß der bei der Gärung der Milch entstehenden Milchsäure auf eingesäte pathogene Keime zu untersuchen. Durch seine Versuche widerlegte er die vielfach vertretene Ansicht, daß die Milchsäuregärung — hauptsächlich durch Milchsäurebildner hervorgerufen — eine relativ hohe desinfizierende Kraft ausübt. Er zeigte vielmehr, daß die Bakterien der Coli-Typhus-Gruppe in der sauren Milch trotz dabei entstandener hoher Säuregrade noch nach mehreren Tagen nachzuweisen waren, so daß die Möglichkeit einer In-

fektion durch diese sauer gewordene Milch noch als sehr wahrscheinlich anzunehmen ist, und diese wegen der langen Aufbewahrungsdauer recht gefährlich werden kann. Er nahm einerseits an, daß das durch die Milchsäure ausfallende Kasein die Bakterien einschließt, und sie so der Säureeinwirkung entzogen werden; andererseits wuchsen auf der sauren Milch bald Schimmelpilze, die einen Teil der gebildeten Milchsäure zersetzen, so daß nur noch ein geringer Teil auf die Bakterien einwirken kann. Außerdem konnte sich die in der sauren Milch erreichte Milchsäurekonzentration nicht so frei auswirken wie in wässriger Lösung, um ihre ganze Desinfektionskraft zu entfalten. Daß das Einschließen der Bakterien durch das ausfallende Kasein einen Schutz für diese bedeutet hat, ist nach Jensen möglich. Er stellte fest, daß oft auf höhere Temperaturen erhitzte Milch anschließend eine größere Keimzahl enthält als vorher, was er auf das durch die Hitze gerinnende Eiweis schiebt, das die Bakterien einschließt und sie so vor weiterer Temperatureinwirkung schützt.

4. Die Beziehungen zwischen Bakterienwachstum und pH.

Über die Beziehungen zwischen Bakterienwachstum und Wasserstoffionenkonzentration haben Speyer und Scheer genauere Untersuchungen gemacht. Speyer zeigte, daß in Milchsäure-Ammoniak-Nährböden bei einer pH-Konzentration von 4,5 das Wachstum von Bakt. coli meist erst nach 48 Stunden eintrat. In saurer Bouillon dagegen konnte er es ohne weiteres bei demselben pH züchten. Dagegen stellte Scheer bei seinen Versuchen fest, daß das Bakt. coli in Natriumlaktat- und Natriumacetatgemischen bei einem pH von 4,7 innerhalb von 24 Stunden abgestorben war. In derselben Nährlösung starben Typhusbakterien bei einem pH von 5,0, Ruhrbakterien (Y, Flexner und Shiga) schon bei einem pH von 5,4 in derselben Zeit ab. Michaelis und Marcora konnten zeigen, daß das Bakt. coli den Aciditätsgrad von 5,0 in milchzuckerhaltigen Nährböden längere Zeit selbst bei einer Temperatur von 37° ohne merklichen Schaden gut ertragen kann.

Bürger hat festgestellt, daß das Bakt. coli gegen 0,5prozentige Milchsäure bzw. 0,5prozentige Essigsäure, deren pH-Werte

ungefähr 2,5 bzw. 3.0 betrugen, viel weniger empfindlich ist als das Bakt. paratyphi und dieses wieder resistenter als Bakt. typhi und dysenteriae. Auch beobachtete er, daß eine höhere Temperatur die Einwirkung der Säure auf Bakterien wesentlich unterstützte. So waren bei Zimmertemperatur die Typhusbakterien noch nach einer Stunde in den Lösungen nachzuweisen, während sie bei 37° bereits abgestorben waren. Diese Beobachtung über die Temperaturwirkung auf die Abtötung der Bakterien machte ich mir zu eigen und arbeitete bei 37°.

Entsprechen die Ergebnisse Scheers über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das Bakterienwachstum den tatsächlichen Verhältnissen, so hätte man bei meinen Untersuchungen über den Einfluß der Zitronensäure auf das Wachstum der Bakterien in den Säuglingsmilchen eine desinfizierende oder hemmende Wirkung durch die Zitronensäure erwarten dürfen, zumal das pH in der Säuremilch wie auch in der Bessaumilch zwischen 4,76 und 5,23 lag.

II.

1. Versuchsanordnung.

Schwartzer und ich haben in einer noch zu veröffentlichenden Arbeit über die Einwirkung der Bessau- und Säuremilch auf das Bakt. coli berichtet. Das Resultat sei kurz angeführt: Das Bakt. coli erreichte in der Säuremilch fast dieselbe Keimzahlhöhe nach 12 Stunden wie in der Vollmilch. In der Bessaumilch blieb die Keimzahl um 2 Dezimalstellen hinter der der Säure- bzw. Vollmilch zurück, erreichte aber nach 48 Stunden dieselbe Höhe wie die beiden anderen Milchsorten.

Ich habe diese Untersuchungen auf die empfindlicheren Typhus-, Paratyphus B- und die Ruhrbakterien (Typ Kruse-Sonne) ausgedehnt.

Die Technik der Untersuchung unterschied sich von der Wedemanns dadurch, daß ich zuerst die Milch mit Zitronensäure ansäuerte, um die Ausfällung des Kaseins zu bewirken. Erst dann säte ich die Bakterien ein, um hierdurch das Einschließen der Keime durch das ausflockende Milcheiweiß zu verhindern.

Zum Verständnis seien die Zusammensetzungen der drei Milcharten kurz angegeben:

1. Vollmilch: auf 100 ccm Vollmilch kommen 2 % Mondamin und 5 % Zucker.
2. Citretten- oder Säuremilch: auf 100 ccm Vollmilch kommen 2 % Mondamin, 5 % Zucker und eine Citrettentablette.
3. Bessaumilch: zu 350 ccm Vollmilch kommen 20 g Mondamin, 50 ccm 5prozentige Zitronensäurelösung, 0,5 g Pepsin, 10 ccm n/1 NaOH in 50 ccm H_2O + 0,2 g Cystin, 5 g Sesamöl in 15 g Eigelb, 100 g Milchzucker in 500 ccm Wasser. Das Ganze wird nach dem Kochen mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt und zum Schluß 100 mg Ascorbinsäure (= 0,05 g Cantan) hinzugefügt.

Alle drei Milchsorten wurden vor dem Versuch mindestens eine halbe Stunde auf 75° bis 80° C erhitzt, um alle vegetativen Keime abzutöten. Zur Beimpfung wurden 12- bis 15stündige Bouillonkulturen verwandt, die mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt wurden, daß man in einen guten Zählbereich kam. Zu der Milch wurde darauf diese Bakterienverdünnung hinzugefügt, und sofort nach der Einsaat und fortlaufend stündlich die Keimzahl der bei Brutschranktemperatur gehaltenen Milch pro ccm bestimmt. Hierbei wandte ich das Plattenzählverfahren an. Die Aussaat fand auf Endoplatten statt. Verglichen wurden die Säuremilch und die Bessaumilch mit der ein wenig durch Zusatz von 2 % Mondamin und 5 % Zucker abgeänderten Vollmilch.

Die pH-Wertbestimmungen fanden mit dem Elektroionometer nach „Lautenschläger" statt unter Benutzung der Chinhydronbezugs- und Messelektrode. Der pH-Wert der drei Milchen änderte sich nach dem Sterilisieren und direkt nach der Einsaat der Bakterien nur um 0,01 gegenüber den vorherigen Werten.

2. Die pH-Änderung nach Einsaat der Bakterien.

Der Säuregrad der Vollmilch schwankte während sämtlicher Untersuchungen zwischen einem pH von 6,46 bis 6,47. Die

Acidität der frischen Milch beruht in erster Linie auf dem Gehalt an primären und sekundären Phosphaten, in nur sehr geringem Grade auf der Menge an Zitronensäure, Kohlensäure und Kasein (Obermeyer, Markley und Rice).

Die Acidität der Säuremilch ergab Werte zwischen pH = 4,76 und pH = 4,91, die der Bessaumilch zwischen pH = 4,85 und 5,23. Die pH-Werte der beiden sauren Milchen sind auf den Zusatz bestimmter Mengen Zitronensäure zurückzuführen.

Die Änderung der Acidität der untersuchten Milchsorten nach Einsaat der verschiedenen pathogenen Keime geben die Tabellen 1 bis 3 wieder.

Alle Tabellen zeigen, daß die Säure- und Bessaumilch ihre anfänglichen pH-Werte am wenigsten geändert haben. Die Voll-

Tabelle 1.

pH-Werte der drei Säuglingsmilchsorten nach Beimpfung mit Bact. typhi.

Zeit in Stunden	Vollmilch	Säuremilch	Bessaumilch
0	6,46	4,91	5,23
1	6,46	4,81	5,15
2	6,45	4,80	5,16
3	6,42	4,79	5,14
4	6,43	4,78	5,11
5	6,49	4,76	5,14
6	6,50	4,75	5,16
7	6,47	4,75	5,14
8	6,44	4,77	5,16
10	6,22	4,77	5,15
11	6,16	4,77	5,13
12	6,09	4,77	5,13
24	5,65	4,66	5,12
48	4,86	4,52	5,10
72	5,56	4,46	5,09
96	5,84	4,44	5,07
120	5,37	4,43	4,98
144	6,04	4,43	4,97
168	5,94	4,39	4,94
192	6,14	—	5,01
216	—	4,45	4,77

Tabelle 2.

pH-Werte der verschiedenen Milchsorten nach Beimpfung mit Bact paratyphi B.

Zeit in Stunden	Vollmilch	Säuremilch	Bessaumilch
0	6,47	4,77	4,88
1	6,51	4,74	4,88
2	6,48	4,74	4,86
3	6,50	4,75	4,87
4	6,48	4,73	4,89
5	6,50	4,72	4,89
6	6,49	4,70	4,88
7	6,49	4,69	4,85
8	6,49	4,70	4,86
10	6,43	4,69	4,85
11	6,29	4,68	4,86
12	6,29	4,67	4,86
24	6,00	4,55	4,92
48	5,56	4,47	4,96
72	4,74	4,44	5,09
144	4,62	4,46	5,54

Tabelle 3.

pH-Werte der 3 Milchsorten nach Beimpfung mit Bact. dysenteriae (Typ Kruse-Sonne).

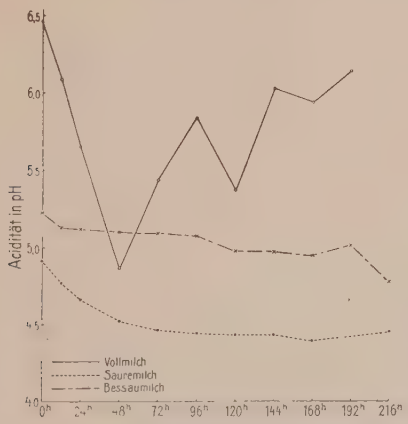
Zeit in Stunden	Vollmilch	Säuremilch	Bessaumilch
0	6,47	4,76	4,85
1	6,47	4,71	4,79
2	6,50	4,74	4,79
4	6,49	4,73	4,80
5	6,46	4,69	4,79
6	6,41	4,69	4,79
7	6,29	4,69	4,79
8	6,14	4,67	4,80
10	6,05	4,64	4,82
11	6,08	4,63	4,80
12	6,12	4,60	4,78
24	5,91	4,41	4,59
48	5,77	4,39	4,51
72	5,77	4,37	4,51
96	4,63	4,35	4,48
120	4,47	4,30	4,46
144	5,50	4,29	4,51
192	4,58	4,26	4,48

milch zeigt nach anfänglicher Beibehaltung des pH-Wertes je nach der eingesäten Bakterienart früher oder später — bei Ruhr z. B. von der 4. Stunde, bei Paratyphus von der 6. und bei Typhus von der 7. Stunde ab — eine allmähliche Zunahme des Säuregrades, die, wie später aus den Tabellen über die Keimzahlvermehrung abzulesen ist, parallel dem Anstieg der Bakterienzahl und der damit verbundenen Zersetzung der Milch geht. Dabei war auffällig, daß bei der Vollmilch die Koagulation mit der Erreichung der Höchstzahl an Keimen zusammenfiel. Durch die Zersetzung der Milch, die zwischen dem 2. und 3. Tage auftrat, verschwand die Koagulation wieder.

Die Zunahme der Acidität beruht auf der Abspaltung von H-Ionen im Verlauf der bakteriellen Stoffwechselprozesse, wobei das Wasserstoffion aus dem H_2O-Molekül, dem Abbau der Kohlenwasserstoffe, der Fette und der N-Verbindung entsteht.

Figur 1.

pH-Änderung der mit **Typhus** beimpften Ernährungsmilchsorten.



Bei der mit Typhus beimpften Vollmilch zeigt sich vom 2. Tage ab eine Abnahme der Acidität, die gegen Ende der Untersuchungen häufigen Schwankungen unterworfen ist und Säuregrade erreicht, die geringer waren als bei frischer Vollmilch. Diese Schwankungen, die durch die Zersetzung des Eiweißes bedingt

sind, zeigt die mit Ruhr beimpfte Vollmilch erst viel später, und bei der mit Paratyphus beimpften Vollmilch ist sie während der ganzen Versuchszeit nicht zu beobachten. Es scheint danach, als ob durch Paratyphus B-Bakterien das Milcheiweiß nicht so leicht oder erst viel später zersetzt wird. Bei der mit den verschiedenen pathogenen Bakterien beimpften Säuremilch ist von Anfang an eine ganz allmähliche Zunahme des Säuregrades zu beobachten. Bei der mit Ruhr beimpften Zitrettenmilch treten während der Versuchsdauer keine pH-Schwankungen auf, während sie bei der mit Typhus beimpften Säuremilch erst nach 192 Stunden, bei der mit Paratyphus beimpften von der 146. Stunde ab zu beobachten sind. Diese pH-Schwankungen für die mit Typhusbakterien beimpfte Milch sind in Figur 1 als Beispiel noch einmal zum Ausdruck gebracht, um sie zu verdeutlichen.

3. Das Wachstum der pathogenen Keime in den Ernährungsmilchen.

Betrachtet man nun die gleichzeitig mit dem pH stündlich bestimmte Keimzahl (s. Tab. 4—6), so sieht man, daß, nachdem die Bakterien sich an das Medium gewöhnt haben, in allen drei Milchen nach ungefähr 2—3 Stunden ein starkes Wachstum einsetzt. In der Säuremilch geht das Wachstum vollkommen parallel dem der Vollmilch, nur ganz minimal stets hinter dieser zurückbleibend. Dies Verhältnis bleibt bis zum 2. Tage bestehen. Von diesem Zeitpunkte ab ist bei der Zitrettenmilch eine allmähliche Abnahme zu beobachten, während sich die Keimzahl in der Vollmilch noch einige Tage ungefähr auf gleicher Höhe hält (s. Tab. 4). Bei der Bessaumilch ist die Keimzahl trotz des etwas schwächeren Säuregrades niedriger als in der Säuremilch, so daß nach 12 Stunden die Bakterienzahl pro ccm um 2 Dezimalstellen hinter der der Vollmilch und 1—2 Dezimalstellen hinter der der Säuremilch bleibt. Auch in den Tabellen 5 und 6, die das Wachstum der Paratyphus B- und Ruhrbakterien (Typ Kruse-Sönne) angeben, ist diese Tatsache immer wieder zu erkennen. Dabei erreicht die Keimzahl der Paratyphusbakterien einen höheren Wert als die der

Typhus- und Ruhrbakterien. Diese Eigentümlichkeit ist wohl auf die verschiedene Resistenz der Bakterien gegenüber Säuren zurückzuführen. So lag die Keimzahl für Bakt. coli pro ccm Milch nach 12 Stunden noch um 2 Dezimalstellen höher als die der Paratyphusbakterien. Hier sei noch einmal auf die Feststellungen von Bürger über die verschiedene Empfindlichkeit der einzelnen Bakterienarten hingewiesen (s. o.).

Um das Anwachsen der Bakterien innerhalt der ersten 12 Stunden noch einmal deutlich zu veranschaulichen, sind in Figur 2 die Keimzahlen des Paratyphus B als Beispiel der Kurve zugrunde ge-

Tabelle 4.

Wachstum des **Bact. typhi**
in den drei Ernährungsmilchen der Säuglinge.

Zeit in Stunden	Vollmilch	Säuremilch	Bessaumilch
0	10^3 . (4,2 ± 0,6)	10^3 . (6,1 ± 1,1)	10^3 . (2,1 ± 0,1)
1	10^3 . (3,0 ± 0,3)	10^3 . (3,3 ± 0,4)	10^3 . (2,3 ± 0,1)
2	10^3 . (3,5 ± 0,3)	10^3 . (3,4 ± 0,1)	10^3 . (2,5 ± 0,9)
3	10^3 . (7,4 ± 0,2)	10^3 . (5,1 ± 2,5)	10^3 . (2,2 ± 0,9)
4	10^4 . (3,1 ± 1,1)	10^3 . (7,0 ± 0,7)	10^3 . (4,2 ± 0,4)
5	10^5 . (1,4 ± 0,2)	10^4 . (1,6 ± 0,9)	10^3 . (8,2 ± 1,0)
6	10^5 . (6,1 ± 0,3)	10^4 . (5,2 ± 0,8)	10^4 . (1,2 ± 0,5)
7	10^6 . (1,7 ± 0,2)	10^5 . (4,5 ± 2,8)	10^4 . (3,1 ± 1,0)
8	10^6 . (6,1 ± 2,0)	10^6 . (4,3 ± 2,9)	10^4 . (4,9 ± 1,6)
10	10^7 . (5,4 ± 0,8)	10^7 . (2,0 ± 1,0)	10^5 . (3,4 ± 0,7)
11	10^8 . (2,6 ± 1,1)	10^7 . (7,8 ± 3,0)	10^5 . (5,8 ± 1,0)
12	10^8 . (5,6 ± 1,2)	10^8 . (2,2 ± 1,3)	10^6 . (2,9 ± 0,5)
24	10^8 . (2,9 ± 1,0)	10^8 . (2,2 ± 1,1)	10^7 . (6,7 ± 2,1)
48	10^8 . (2,4 ± 0,4)	10^7 . (4,9 ± 0,8)	10^8 . (1,1 ± 1,0)
72	10^7 . (7,9 ± 1,1)	10^6 . (6,1 ± 1,5)	10^6 . (8,3 ± 5,0)
96	10^7 . (3,6 ± 0,6)	10^6 . (5,9 ± 0,9)	10^6 . (2,8 ± 0,2)
120	10^7 . (2,0 ± 0,4)	10^5 . (4,8 ± 0,7)	10^6 . (4,8 ± 1,6)
144	10^5 . (7,3 ± 0,9)	steril	10^5 . (1,0 ± 0,3)
168	10^2 . (6,8 ± 1,7)	„	10^5 . (5,2 ± 1,5)
192	10^3 . (4,8 ± 1,7)	„	10^6 . (4,7 ± 0,6)
216	10^2 . (1,1 ± 0,5)	„	10^7 . (2,7 ± 0,4)
264	steril	„	10^7 . (5,1 ± 0,1)
288	„	„	10^8 . (1,2 ± 0,1)

Die Zahlen sind Mittelwerte aus mindestens vier Untersuchungen mit Angabe des mittleren Fehlers.

Tabelle 5.

Wachstum des **Bact. paratyphi B**
in den drei Ernährungsmilchen der Säuglinge.

Zeit in Stunden	Vollmilch	Säuremilch	Bessaumilch
0	10^2 . (4,6 ± 1,1)	10^2 . (4,4 ± 0,8)	10^2 . (2,5 ± 0,3)
1	10^2 . (7,6 ± 1,1)	10^2 . (4,8 ± 0,4)	10^2 . (2,4 ± 0,3)
2	10^2 . (9,5 ± 3,0)	10^3 . (1,1 ± 0,1)	10^2 . (2,6 ± 0,4)
3	10^4 . (2,5 ± 1,9)	10^3 . (2,6 ± 0,8)	10^2 . (5,2 ± 1,4)
4	10^4 . (6,8 ± 0,7)	10^4 . (1,6 ± 0,3)	10^3 . (2,6 ± 0,5)
5	10^5 . (3,3 ± 1,5)	10^5 . (1,2 ± 0,2)	10^4 . (1,2 ± 0,3)
6	10^6 . (1,8 ± 0,3)	10^5 . (7,3 ± 1,0)	10^4 . (2,4 ± 0,2)
7	10^6 . (8,1 ± 0,8)	10^6 . (2,7 ± 0,3)	10^4 . (7,0 ± 1,3)
8	10^7 . (1,3 ± 0,3)	10^7 . (1,2 ± 0,4)	10^5 . (4,0 ± 1,0)
9	10^7 . (6,3 ± 2,2)	10^7 . (8,5 ± 1,5)	10^6 . (1,1 ± 0,3)
10	10^8 . (2,4 ± 1,3)	10^8 . (2,8 ± 1,6)	10^6 . (1,6 ± 0,7)
11	10^9 . (4,1 ± 1,7)	10^8 . (5,1 ± 1,9)	10^7 . (1,0 ± 0,3)
12	10^9 . (8,9 ± 5,8)	10^9 . (1,5 ± 0,6)	10^7 . (3,0 ± 1,4)
24	10^{10}. (1,1 ± 0,6)	10^9 . (1,3 ± 0,6)	10^8 . (2,8 ± 0,9)
48	10^{10}. (4,1 ± 1,3)	10^8 . (6,4 ± 1,8)	10^9 . (2,5 ± 0,2)
72	10^6 . (1,0 ± 0,1)	10^8 . (4,2 ± 1,7)	10^8 . (4,1 ± 1,7)
144	steril	steril	10^4 . (1,8 ± 0,6)

Tabelle 6.

Wachtum des **Bact. dysenteriae** (Typ Kruse-Sonne)
in den Ernährungsmilchen der Säuglinge.

Zeit in Stunden	Vollmilch	Säuremilch	Bessaumilch
0	10^3 . (4,2 ± 0,2)	10^3 . (4,1 ± 0,9)	10^3 . (4,5 ± 0,9)
1	10^3 . (4,6 ± 0,2)	10^3 . (6,5 ± 0,1)	10^3 . (5,0 ± 2,0)
2	10^4 . (8,6 ± 0,2)	10^4 . (3,0 ± 0,5)	10^3 . (3,8 ± 0,9)
4	10^5 . (4,9 ± 1,5)	10^5 . (2,8 ± 0,5)	10^4 . (2,2 ± 0,5)
5	10^6 . (6,9 ± 0,1)	10^6 . (1,4 ± 0,2)	10^4 . (3,8 ± 2,2)
6	10^7 . (2,4 ± 0,5)	10^6 . (2,5 ± 0,3)	10^4 . (6,6 ± 1,8)
7	10^7 . (5,3 ± 1,2)	10^6 . (8,4 ± 0,6)	10^5 . (1,7 ± 0,7)
8	10^8 . (1,4 ± 0,2)	10^7 . (3,3 ± 1,3)	10^5 . (4,2 ± 1,7)
10	10^8 . (2,5 ± 0,4)	10^7 . (7,7 ± 2,1)	10^6 . (1,5 ± 0,8)
11	10^7 . (9,9 ± 0,6)	10^7 . (4,0 ± 0,6)	10^6 . (1,4 ± 0,6)
12	10^8 . (1,8 ± 0,2)	10^7 . (4,9 ± 1,7)	10^6 . (4,3 ± 0,9)
24	10^8 . (3,9 ± 0,7)	10^7 . (4,3 ± 1,2)	10^7 . (1,5 ± 0,2)
48	10^8 . (2,2 ± 0,3)	10^7 . (3,3 ± 1,0)	10^8 . (1,2 ± 0,1)
72	10^8 . (2,3 ± 0,6)	10^7 . (5,4 ± 0,1)	10^7 . (3,8 ± 0,4)
96	10^8 . (1,7 ± 0,9)	10^7 . (2,4 ± 0,4)	10^6 . (4,4 ± 1,9)
120	10^8 . (1,7 ± 1,3)	10^7 . (3,7 ± 0,9)	10^5 . (8,3 ± 4,7)
144	10^8 . (1,9 ± 1,3)	10^7 . (3,9 ± 1,0)	10^5 . (4,1 ± 2,0)
192	steril	10^3 . (2,8 ± 1,2)	10^2 . (4,8 ± 2,6)

legt. Alte Erfahrungen der Keimzahlbestimmungen zeigen immer wieder, daß bei Brutschranktemperatur zu dieser Zeit meist das Maximum der Keimzahl erreicht ist, oder doch nur noch ein geringer Anstieg zu verzeichnen ist.

Betrachtet man das Wachstum der pathogenen Bakterien der Coli-Typhusgruppe innerhalb der ersten 12 Stunden und stellt die erhaltenen Werte als Wachstumskurve dar, so sieht man, daß die Population eine Exponentialfunktion ist, d. h. der Lagarithmus der Funktion ergibt für die ersten 12 Stunden eine Grade, deren Formel

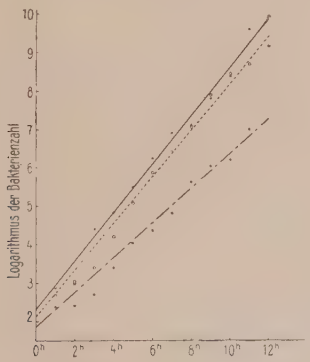
$$y = a + bx$$

lautet.

Die gegebenen Punkte sind in der Figur 2 durch eine Grade unter Verwendung der Methode der „kleinsten Quadrate" ausgeglichen.

Figur 2.

Die für Bact. paratyphi B unter Verwendung der Methode der „kleinsten Quadrate" ausgeglichene Wachstumskurve.



Für die beiden Konstanten a und b der obigen Formel, die von dem jeweiligen Material abhängen, ergeben sich die beiden folgenden Gleichungen:

$$a = \frac{[y] \cdot [x^2] - [x] \cdot [xy]}{n \cdot [x^2] - [x] \cdot [x]}$$

$$b = \frac{n \cdot [xy] - [x] \cdot [y]}{n \cdot [x^2] - [x] \cdot [x]}$$

wo in der Ausgleichsrechnung das Zeichen [ ] = Summe bedeutet. In diesen Gleichungen sind:

x = Anzahl der Versuche
y = Anzahl der Stunden
n = Logarithmus der Bakterienzal

Für die Konstanten erhielt ich die Werte:

	a	b
Vollmilch	2,167	0,649
Säuremilch	2,015	0,639
Bessaumilch	2,233	0,489

Betrachtet man das Verhalten der Mikroorganismen in der Vollmilch nach der 12. Stunde, so ist zu bemerken, daß die Zahl der Typhus- und Paratyphus B-Bakterien von der 48. Stunde ab allmählich kleiner wird. Nach 144 Stunden ist die mit Paratyphus B beimpfte, nach 216 Stunden die mit Typhus beimpfte Vollmilch steril. Die Ruhrbakterien zeigen aber eine über mehrere Tage hinaus gleichbleibende Höhe und sind nach 192 Stunden abgetötet.

Etwas anders ist das Verhalten der Säuremilch auf die drei Keimarten. Während Typhus und Paratyphus B von der 24. Stunde ab eine allmähliche Verminderung erkennen lassen und nach 144 Stunden abgetötet sind, bleibt die Keimzahl der Ruhrbakterien bis zur 144. Stunde fast auf gleicher Höhe, um dann erst abzufallen. Zur 192. Stunde sind in ihr noch 10^3 Keime pro ccm Säuremilch enthalten.

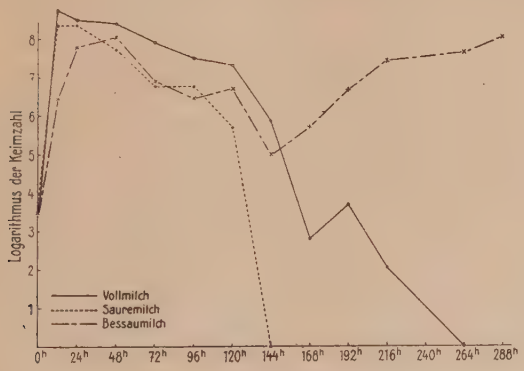
Eigentümlich ist das Verhalten der Bakterien in der Bessaumilch. In ihr erreichen erst nach 48 Stunden alle drei Keimarten dasselbe Maximum wie in der Voll- bzw. Säuremilch. Anschließend ist bei allen eine Abnahme bis zur 144. Stunde zu beobachten, und während Paratyphus B- und Ruhrbakterien weiterhin ab-

nehmen, tritt bei den Typhusbakterien ein erneutes Anwachsen der Keimzahl in den folgenden Tagen abermals auf, und zwar zum zweiten Male erreichen sie nach 288 Stunden dieselbe Höhe wie nach 48 Stunden (s. Fig. 3).

Besonders merkwürdig ist, daß die Ruhrbakterien, die sehr empfindlich sind, die Säure so lange ohne Schaden ertragen haben, macht doch Jakoby die Säure im Stuhl für das schnelle Absterben verantwortlich.

Figur 3.

Wachstumskurve der mit **Typhus** beimpften Ernährungsmilchsorten.



Daß durch die Zitronensäure in der in der Milch vorkommenden Konzentration eine solche geringe bakterizide Wirkung entfaltet wird, ist erklärlich, wenn man weiß, daß Eiweiß und in noch stärkerem Maße seine Spaltungsprodukte das Desinfektionsvermögen stark herabsetzen. Auch konnte u. a. Held zeigen, daß Eiweiß und eiweißartige Körper Säuren stark binden. Damit stimmt auch überein, daß die Konservierung sehr stark eiweißhaltiger Nahrungsmittel durch Säuren auf große Schwierigkeiten stößt, und darum ist es notwendig, erheblich höhere Säurekonzentrationen zu nehmen, um wenigstens zu einer Hemmung selbst empfindlicher Bakterien zu gelangen.

4. Die Ursache der Hemmung in der Bessaumilch.

In nachstehenden Untersuchungen glaube ich eine Erklärung für die hemmende Wirkung der Bessaumilch auf die untersuchten pathogenen Erreger gefunden zu haben.

Zunächst prüfte ich das Zusammenwirken der einzelnen in der Bessaumilch vorkommenden Zutaten. Zu diesem Zwecke wurden 5 Kolben mit den folgenden Substanzen im entsprechenden Verhältnis angesetzt:

Kolben I: 2,5 ccm Zitronensäure (5 %) auf 50 ccm mit Leitungswasser aufgefüllt.

Kolben II: 2,5 ccm Zitronensäure, 0,25 ccm Sesamöl mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

Kolben III: 2,5 ccm Zitronensäure, 0,25 ccm Sesamöl, 5,0 g Milchzucker mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt.

Kolben IV: Inhalt wie Kolben III, dazu 5 mg Ascorbinsäure.

Kolben V: Inhalt wie Kolben IV, dazu ½ ccm n 1 NaOH.

Alle Kolben wurden mit ½ ccm einer mit Kochsalzlösung verdünnten 12 Stunden alten Bouillonkultur von Typhusbakterien beimpft, und zu den in Tabelle 7 zu ersehenden Zeiten die Keimzahl bestimmt.

Tabelle 7.

Das Verhalten der Ty-Bakterien in den 5 Kolben (s. o.).

	I	II	III	IV	V
	pH = 3,09	pH = 3,10	pH = 3,05	pH = 3,05	pH = 4,01
Einsaat	3 440	3 100	3 720	3 350	4 160
½ h	steril	3 600	4 320	2 760	3 840
1 h	„	182	5 560	3 600	2 240
3 h	„	steril	3 660	3 300	3 600
4 h	„	„	2 320	1 500	4 110
6 h	„	„	800	550	4 420
9 h	„	„	560	380	4 160
24 h	„	„	steril	steril	21 680
48 h	—	—	„	„	36 800
72 h	—	—	—	„	18 400

Die Wirkung des Pepsins wurde nicht geprüft, da nach den Untersuchungen von Scheer und Gregersen diesem Wirkstoff keine baktericide Wirkung zuzuschreiben ist. Beide wiesen in ihren Arbeiten über die Baktericidie des Magensaftes nach, daß allein nur die Salzsäure für die desinfizierende Wirkung in Frage kommt, und daß das für den Abbau der Eiweißkörper so wichtige Pepsin keinen Einfluß ausübt.

Die Tabelle 7 gibt das Ergebnis der Untersuchungen wieder. Zwar ist das pH stärker als in der Bessaumilch, da hier keine Bindung der Säure durch Eiweißkörper stattfinden kann. Deutlich ist jedoch aus ihr abzulesen, daß allein die Zitronensäure die wirksame Substanz ist, die baktericid wirkt. Der minimale Zusatz von 0,25 ccm Sesamöl zu der in Kolben I befindlichen Lösung vermag die Desinfektionskraft der Zitronensäure schon etwas zu mindern. Noch mehr setzt der beigefügte Milchzucker — wohl als Nährmedium wirkend — die keimtötende Wirkung herab, obwohl das pH in Kolben IV und III sogar — wenn auch sehr gering — stärker ist als in Kolben I und II. Die zugesetzte Ascorbinsäure in Kolben V übt keinen Einfluß aus. Die in Kolben V zugefügte Natronlauge verschob die Acidität zum Neutralpunkt hin auf ein pH von 4,01. Diese Änderung des Säuregrades bedingt zunächst zwar eine nicht merkliche, dann aber mächtige Vermehrung der Typhusbakterien, wobei wieder auffällig ist, daß nach 48 Stunden das Maximum der Keimzahl erreicht ist, um dann wieder abzufallen.

Daß die durch die Zitronensäure bedingte Acidität für die Wachstumshemmung in der Bessaumilch nicht allein in Frage kommen kann, ist dadurch zu erklären, daß die H.-Konzentration gegenüber der Säuremilch immer geringer war. Trotzdem zeigt diese stets ein starkes Wachstum. Der Gedanke liegt nahe, diese Wirkung auf die verdünnte Milch zurückzuführen, denn die Bessaumilch ist eine etwa $^1/_3$-Säuremilch. In früheren Versuchen über die Vermehrung des Bakt. coli in der Vollmilch und einer mit Wasser verdünnten $^1/_3$-Vollmilch konnte ich zeigen, daß ein verdünnter und damit schlechterer Nährboden keinen Einfluß auf die Vermehrung des Bakt. coli ausübt. Nach 12 Stunden erreichte die Keimzahl in beiden Milchnährböden die gleiche Höhe.

Die vergleichende Untersuchung von Säuremilch und einer $^1/_3$-Säuremilch ergab folgendes: Die $^1/_3$-Säuremilch, die aus $^1/_3$ Vollmilch, $^2/_3$ Wasser, 2 % Mondamin und 5 % Zucker, dazu auf 100 ccm Flüssigkeit eine Citrettentablette hinzugefügt, hergestellt war, und deren pH mit der unverdünnten Säuremilch durch Hinzufügen einer bestimmten Menge NaOH-Lösung so eingestellt war, daß das pH gleich war, zeigte mit Bakt. typhi geprüft eine langsamere Zunahme der Keimzahl gegenüber der unverdünnten Säuremilch. Nach 12 Stunden war diese in der $^1/_3$-Säuremilch um 2 Dezimalstellen zurückgeblieben und erreichte dieselbe Höhe wie die unverdünnte Säuremilch erst nach 48 Stunden. Daraus geht eindeutig hervor, daß die Pufferung der Bessaumilch entsprechend ihrem geringeren Gehalt an Milcheiweiß schlechter ist, und daher die Säure in dem mehr wässerigem Medium auf das Wachstum der Bakterien besser einwirken kann.

5. Untersuchung auf Schädigung der Bakterien durch die Milchen.

Untersucht wurde ferner, ob eine Änderung in dem biologischen Verhalten der Bakterien gegenüber den verschiedenen zur Differenzierung der Typen erforderlichen Nährböden eingetreten war. Die verschiedenen Erreger wurden nach Einwirkung der in der Milch enthaltenden Zitronensäure zur Einsaat und nach stets weiteren 24 Stunden in die verschiedensten Nährböden gebracht. Es konnte diesen gegenüber keine Veränderung in ihrem typischen Verhalten beobachtet werden. Nur auf den Endoplatten sah die Wuchsform der Kolonien besonders innerhalb der ersten Tage verändert aus. Dies verlor sich aber wieder nach einigen Tagen. Das spricht vielleicht für eine vorübergehende Schädigung.

Ergebnis.

Untersucht wurde die Einwirkung der heute gebräuchlichsten Ernährungsmilchen auf die pathogenen Keime der Coli-Typhus-Gruppe.

Verglichen wurde das Verhalten des Wachstums der Bakterien in der Bessau- und Citrettenmilch gegenüber der Vollmilch.

Die drei Ernährungsmilchen — Bessaumilch, Citrettenmilch und Vollmilch — waren gute Nährböden für Bakt. typhi, paratyphi B und dysenteriae (Typ Kruse-Sonne).

Während die Vollmilch und die Säuremilch den Gipfel der Keimzahl stets nach 12 Stunden erreichten, trat das Maximum in der Bessaumilch für die untersuchten Erreger erst nach 48 Stunden auf.

Die erreichte Keimzahlhöhe richtet sich nach der Empfindlichkeit der geprüften Bakterien gegenüber Säuren und nahm die bekannte Reihenfolge Paratyphus B, Typhus und Ruhr ein. Hinter Bakt. coli, das in früher gemachten Untersuchungen in den Milchen Keimzahlwerte von 10^{12} Keimen pro ccm Milch erreichte, blieb Paratyphus B mit Höchstwerten von 10^{10} Keimen zurück, und Typhus und Ruhr erreichten nur Werte von 10^{8} Keimen pro ccm Milch.

Die Citrettenmilch wirkte mit ihrem pH von 4,76 bis 4,91 gegenüber der Vollmilch mit ihrem pH von 6,46 bis 6,47 weder bactericid noch hemmend auf des Wachstum. Die Bessaumilch, deren pH zwischen 4,85 und 5,23 lag, zeigte trotz geringerer Wasserstoffionenkonzentration deutliche Wachstumshemmung. Diese Hemmung ist auf das freiere Auswirken der Zitronensäure in $^1/_3$ verdünnter Milch zurückzuführen.

Die Konzentration der Zitronensäure in der Milch reicht nicht aus, um die Bakterien selbst nach längerer Einwirkung abzutöten, wobei es offen bleibt, ob nicht durch die Säurung die baktericide Wirkung des Magensaftes so unterstützt wird, daß die Bakterien im Magen nach kurzer Zeit absterben, und die Möglichkeit des Hineingelangens in den Säuglingsdarm beseitigt wird.

Eine Veränderung der Bakterien in ihrer Wirkung gegenüber differenzierten Nährmedien der durch die Säure in der Milch zunächst geschädigten Wuchsformen hat sich nicht gezeigt.

Schlüsse für die Praxis lassen sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht ziehen, da die im Experiment notwendigerweise gewählte massenhafte Einsaat von Bakterien im täglichen Leben nicht vorkommt und unter den gewöhnlichen Bedingungen der Ernährung des Säuglings die Säurung der Milch, wie sie bei der Citrettenmilch stattfindet, ihre hemmende Wirkung auf das Bakterienwachstum in genügendem Maße entfalten dürfte.

Schrifttum.

Bürger, M. Münch. Med. Wschr. I, 318, 1918.
Dresel, E. G. Zentr. f. Bakt. 97, 178, 1926.
Fermi, C. Zentr. f. Bakt. 23, 208, 1898.
Gregersen, J. P. Zentr. f. Bakt. 77, 353, 1916.
Hailer, K. Weyls Handbuch d. Hyg., Abt. Desinfektion.
Hanssen, K. Zentr. f. Bakt. 62, 89, 1912.
Held, D. Arch. f. Hyg. 84, 289, 1915.
Jakoby, F. Zentr. f. Bakt. 90, 1, 1920.
Jensen, zitiert nach Wedemann.
Liefmann, A. Diss. Freiburg 1902.
Markley, A. L. und Ritz, F. E. J. Dairy Sci. 7, 1924.
Michaelis und Marcora. Z. f. Immunforschg. 14, 170, 1912.
Obermeyer, W. Diss. Frankfurt 1919.
Riegel, K. Arch. f. Hyg. 61, 217, 1907.
Scheer, K. Zentr. f. Bakt. 33, 36, 1922.
Scheer, K. Arch. f. Hyg. 88, 130, 1919.
Schlüter, G. Zentr. f. Bakt. 11, 589, 1892.
Schulz-Schultzenstein. Zentr. f. Bakt. 30, 785, 1901.
Schwartzer und Korth, W. demnächst veröffentlicht.
Speyer, A. Zentr. f. Bakt. 93, 340, 1924.
Uffelmann. Berl. Klin. Wschr. 39, 1891.
Wedemann. Zentr. f. Bakt. 97, 50*, 1926.

Zum Schluß möchte ich nicht versäumen, meinem hochverehrten Chef, Herrn Prof. Schütz an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank für sein großes Interesse und Entgegenkommen bei dieser Arbeit auszusprechen.

Lebenslauf.

Am 9. Oktober 1910 wurde ich als Sohn des damaligen Zollinspektors und Oberleutnants d. R. Ulrich Korth und seiner Ehefrau Marie-Luise geb. Prümers in Kanth, Kreis Breslau, geboren. In Minden i. Westf. besuchte ich die Mittelschule und die Bessel-Oberrealschule, an der ich im Frühjahr 1931 die Reifeprüfung ablegte. Nach praktischer Tätigkeit vom 1. 4. 1931 bis 18. 4. 1932 in Fabrikbetrieben in Minden und Göttingen, ergriff ich im Sommer-Semester 1932 das Studium der Medizin. Sämtlich Semester studierte ich in Göttingen und machte im Oktober 1934 das ärztliche Vorexamen, im September 1938 das ärztliche Staatsexamen. Unterbrochen wurde das Studium von Herbst 1934 bis Herbst 1935 wegen freiwilligen Dienstes in der Wehrmacht. Von Anfang Oktober bis Ende November 1938 war ich als Medizinalpraktikant am Hygienischen Institut, anschließend vier Monate in der Kinderklinik der Universität Göttingen tätig. Seit dem 1. April 1939 bin ich mit der Verwaltung der wissenschaftlichen Assistentenstelle am Hygienischen Institut der Universität Göttingen beauftragt. Seit August 1939 diene ich wieder bei der Wehrmacht. Als Schütze kämpfte ich in Polen mit. Am 15. Dezember 1939 wurde ich als Unterarzt zur Sanitäts-Staffel Göttingen zur Dienstleistung für den beratenden Hygieniker versetzt. Mit Wirkung vom 1. Februar 1939 erhielt ich die Bestallung als Arzt.

Werner Korth.